

18/02/2020

INTRODUZIONE AI FONDAMENTI DI ISTOLOGIA

Camillo Golgi (1843-1926) ricevette il premio Nobel come **Cajal**. Secondo Camillo Golgi un buon preparato rappresenta una miniera, e ciò sottolinea l'importanza che entrambi davano al **processo di visualizzazione**. È molto importante l'utilizzo di colorazioni per differenziare in modo più evidente le strutture che compongono e caratterizzano i vari preparati istologici. La colorazione generale **HE/EE** (**colorazione con ematossilina eosina** → è la colorazione di base nello studio microscopico dei tessuti animali e negli esami istopatologici di routine) non è sufficiente per riuscire a discriminare le componenti dei preparati. Se vogliamo visualizzare una certa struttura è importante utilizzare una specifica colorazione. Golgi mise a punto una colorazione - Golgi scoprì che il nitrato di argento interagiva con il citosol del neurone, che davano vita a dei precipitati (che sono alla base delle strutture analogiche di fotografia). Questa reazione permette di ottenere un'ottima colorazione del tessuto nervoso, soprattutto nelle zone più piccole. Infatti proprio le zone più piccole del tessuto nervoso sono il punto di forza della colorazione del Golgi. È possibile definire la colorazione del Golgi come casuale, in quanto spesso viene utilizzata per colorare solamente una zona del tessuto nervoso. Per quanto può sembrare scontata come cosa non lo è, andando a colorare tutto il tessuto si andrebbe a creare una difficoltà nell'analisi in quanto il tessuto nervoso è un tessuto molto compatto, - che purtroppo risultò inefficiente, in cui non colorava tutti i neuroni ma solamente alcuni. Nonostante ciò il fatto che la colorazione del Golgi colorasse solamente pochi neuroni costituì un grande vantaggio per Cajal perché poté distinguere il singolo neurone.

Per dimostrare che il neurone è l'unità singola del tessuto nervoso avremmo dovuto:

- dimostrare che esiste un modo con cui il neurone comunica con le altre cellule e ⇒ che esiste uno spazio tra le unità fondamentali.
- che il segnale passa da una cellula all'altra senza dover essere necessariamente in contatto.

(riprendere appunti sulla matrice extracellulare/regolazione genica)

25/02/2020

DIFFERENZIAMENTO CELLULARE

Da un punto di vista morfologico possiamo distinguere quattro diversi tipi di tessuto nel nostro organismo mettendo insieme i quali è possibile costruire tutti gli organi del nostro corpo:

1. Tessuto epiteliale. Può essere definito come *un tessuto fatto da cellule unite a mutuo contatto senza che tra l'una e l'altra si interponga sostanza intercellulare*. Per caratterizzare il tessuto epiteliale ci serviamo quindi del dato morfologico, del fatto cioè che le cellule siano unite tra loro. È chiaro che in questa specifica caratteristica morfologica saranno in gioco giunzioni intercellulari specializzate.
2. Tessuto connettivo. E anch'esso identificabile su base morfologica in quanto costituito da cellule separate le une dalle altre tramite l'interposizione di una sostanza intercellulare.
3. Tessuto muscolare. In questo caso ad una definizione morfologica aggiungiamo una definizione riguardante la funzione di questo tessuto: il tessuto muscolare *è identificabile in quanto formato da elementi allungati capaci di contrarsi attivamente ed esercitare un lavoro*.
4. Tessuto nervoso. È identificabile in quanto costituito da cellule dotate di prolungamenti in contatto reciproco o con altri tipi di cellule di altri tessuti ed in cui è sviluppata al massimo grado una delle caratteristiche della materia vivente cioè l'eccitabilità.

↓

Tessuto epiteliale: riveste superfici e cavità corporee e forma le ghiandole.

Tessuto connettivo: sostiene dal punto di vista funzionale e strutturale gli altri tipi di tessuto di base.

Tessuto muscolare: che è costituito da cellule contrattili ed è responsabile del movimento.

Tessuto nervoso: che riceve, trasmette e integra le informazioni Provenienti dall'interno e dall'esterno del corpo.

I fattori della determinazione cellulare sono:

- **Fattori intrinseci:** e.g. neurogenesi in Drosophila
- **Fattori estrinseci:**
 - Hedgehog (Hh)
 - Bone Morphogenetic Protein (BMP)
 - Wnt (Wingless/Int1)
 - Steroid hormone receptor
 - Notch
 - Receptor Tyrosine kinase (RTK)

Differenziamento: processo di formazione di cellule specializzate

Impegno (Commitment): misura dell'adesione a uno specifico destino differenziativo

Specificazione e determinazione: fasi successive dell'impegno cellulare

Il paradigma di Giulio Bizzozero sulla rigenerazione tissutale è rimasto valido per quasi cento anni.

Era basato sull'osservazione di Flemming che la rigenerazione in un tessuto avviene per divisione cellulare.

Quindi, per Bizzozero la proporzione di cellule in mitosi osservata è un indice della capacità rigenerativa di un tessuto.

I tessuti che costituiscono gli esseri viventi si classificano in: “**Labili**”, “**Stabili**” o “**Perenni**”.

Le cellule dei tessuti **labili** si dividono continuamente per tutta la vita per mitosi, con nuovi elementi che rimpiazzano le cellule perse. A questa categoria appartengono tra gli altri alcune ghiandole (testicolo, ovario, sistema linfatico, stomaco, intestino), il midollo osseo e la milza.

I tessuti **stabili** sono caratterizzati da cellule che si dividono fino alla nascita o fino a qualche tempo dopo (per esempio: fegato, ossa e muscolo liscio).

I tessuti **perenni** includono il sistema nervoso ed il muscolo striato.

In questi tessuti formati da cellule post-mitotiche il pool di cellule germinali si esaurisce durante lo sviluppo.

03/03/2020

Definizione di cellule staminali

Alla base del differenziamento c'è un meccanismo di regolazione genica. Il differenziamento non è un processo che si ferma con la fine dello sviluppo di un organismo, ma alcuni tessuti continuano a proliferare anche durante la vita adulta, in modo continuo, ma anche la cute (tutti quei tessuti che sono soggetti ad usura).

Le cellule staminali sono capaci di autorigenerarsi (indefinitamente), self renewal; e di generare molti tipi cellulari diversi.

Le cellule staminali sono cellule che quando si dividono generano, una cellula che andrà incontro a differenziamento e l'altra che rimarrà staminale, in modo che il pool genetico possa rimanere sempre attivo.

Potenzialità → La misura di quanti tipi di cellule specializzate una cellula staminale può generare.

Pluripotente → La prima cellula che viene generata ha massima potenzialità perché può generare **tutti** i tipi di cellule specializzate nel corpo (pluripotente). Ad esempio nel caso delle ESC (Embryonic stem cells - cellule staminali).

Multipotente → La cellula che può generare tipi **multipli** di cellule del tessuto di appartenenza, ma non tutti i tipi. Le cellule staminali tessuto-specifiche sono multipotenti.

Se nelle cellule della massa interna dell'embrione in coltura pongo alcuni fattori arrivo a formare dei tessuti diversi, tutto questo dipende dalla tipologia di fattori che vengono inseriti nelle cellule nel momento in cui sono in coltura.

Cellule staminali che si formano in seguito alla formazione del tubo neurale, che in seguito si distaccano e si diffondono. Sono un caso di cellule pluripotenti.

Cellule staminali totipotenti cominciano a perdere potenzialità \Rightarrow diventano cellule staminali pluripotenti multipotenti (neurali, ematopoietiche, ecc...), perdendo ancora potenzialità si ottengono \Rightarrow staminali unipotenti e successivamente \Rightarrow cellule differenziate.

Queste cellule staminali una volta arrivate ad un livello di potenzialità pari a zero (quindi una volta arrivate ad essere delle cellule completamente differenziate) possono tornare al livello di potenzialità delle cellule pluripotenti. Questo meccanismo è definito *induced pluripotent stem cells* (**iPSC**).

Se prendo cellule della cute, mettendole in coltura, ed inserendo dei fattori di trascrizione, che entrano nella cellula, possono generare qualsiasi tipo di tessuto \Rightarrow queste cellule diventano infine iPSC.

Si scoprì che inserendo il fattore di trascrizione MyoD nei fibroblasti si arrivava alla generazione di tessuti muscolari.

La riprogrammazione (pecora Dolly)

Se prendo le cellule della pelle (solo nucleo) di una pecora \rightarrow lo metto nella cellula uovo di un'altra pecora priva di nucleo \rightarrow si verifica la perdita dell'organizzazione che hanno nella cellula e il citoplasma della cellula uovo non fecondata risulta sufficiente per riprogrammare completamente il nucleo. Quindi da questa ricombinazione e riorganizzazione è possibile arrivare alla formazione di tutti i tipi di tessuti del corpo.

La coltura delle cellule staminali pluripotenti sono usate per la formazione di cellule e tessuti per la terapia, ma anche per esperimenti, per testare farmaci e per avere dei modelli da studiare.

10/03/2020

Il virus ha la capacità di infettare un gran numero di persone, e poi di diminuire. Quindi in modo inevitabile un virus presenta un momento di picco e un momento di quiescenza.

Ci sono delle tecniche di microscopia che fanno vedere alcune strutture della cellula ma non hanno la capacità di farci vedere, come nel contrasto ad interferenza, come la cellula in tre dimensioni. Se usassimo il campo chiaro in un tessuto non trattato avremmo un risultato poco utilizzabile dal punto di vista dell'analisi dell'immagine.

1. **Fissazione:** quando abbiamo un tessuto fresco dobbiamo bloccare i processi cellulari perché solo così facendo possiamo ottenere un preparato che non si degrada nel tempo. Tutti i fissativi devono necessariamente essere preparati come soluzioni isotoniche e a pH = 7.4, per impedire fenomeni di collassamento o di rigonfiamento dei campioni, legati agli stress osmotici. Arresta il metabolismo cellulare, previene la degradazione della cellula dei tessuti, uccide microorganismi patogeni che potrebbero degradare il tessuto, rende il tessuto compatto (attraverso il **crosslink**, cioè la formazione di legami covalenti, e la denaturazione delle proteine).
2. **Inclusione:** i composti devono essere posti una sostanza che poi solidifica e che poi consente la formazione di blocchi che risultano più facili da manipolare. Normalmente si usa la **paraffina**, insieme di idrocarburi che si solidificano e che raggiungono lo stato liquido a temperature non tanto alte (52-60 gradi), ma vengono usate anche delle resine) (strumento \rightarrow criostato). In definitiva, l'inclusione consiste nel lasciar permeare il tessuto da una sostanza che solidifica a temperatura ambiente alta a consentire il taglio in sezioni sottili dello spessore di pochi micron.
3. **Taglio:** quando tagliamo una struttura tridimensionale di tessuto devo considerare che questo tessuto viene tagliato in modo così sottile che perde la tridimensionalità e acquisisce carattere bidimensionale. Non tutte le fettine che abbiamo due tessuto mostrano la stessa cosa. A seconda del piano di taglio e della struttura interna del tessuto che sto analizzando vedo cose diverse. **Dobbiamo considerare che quando taglio guadagno in visione ma perdo informazioni sulla tridimensionalità.**

Piano di taglio possono essere:

- **sezione longitudinale:** tessuto tagliato seguendo la direzione dell'asse maggiore dell'organo. Non c'è un unico piano, ma ce ne sono di più.
- **sezione trasversale:** tessuto tagliato perpendicolarmente alla lunghezza dell'organo. Se ho una struttura tubulare, uso il piano ortogonale alla lunghezza dell'organo e ottengo immagini che sono diverse tra loro a seconda della posizione del piano. Per capire cosa sto osservando devo guardare anche le sezioni successive per cercare di ricostruire la struttura tridimensionale.
- **sezione obliqua:** tessuto tagliato con un angolo rispetto all'asse longitudinale e trasversale.

4. **Colorazione (pagina 24,25,26,27, 30 sbobine):** se coloro con dei coloranti che mettono in evidenza delle strutture particolari del tessuto, ci è possibile distinguere delle parti rispetto ad altre. I coloranti si legano ai tessuti mediante legami chimici con le proteine, gli acidi nucleici, le glicoproteine e le lipoproteine. I coloranti sono classificati in due categorie: *coloranti acidi*, nei quali il gruppo cromoforo è acido (anionico) e *coloranti basici*, nei quali il gruppo cromoforo è basico (cationico). I componenti dei tessuti che hanno affinità per i coloranti acidi sono detti *acidofili*; quelli che mostrano affinità per i coloranti basici sono detti *basofili*. L'acidofilia e la basofilia dei vari costituenti cellulari dipendono dal pH della soluzione colorante. I coloranti sono di regola indiretti in quanto la loro fissazione al tessuto necessita l'impiego di mordenzatori, ossia degli ossidanti che fu fino da mezzo intermedio di collegamento tra strutture tissutali e colorante, fra i quali non esiste una particolare affinità. In tal senso i singoli coloranti possono essere applicati successivamente ovvero contemporaneamente sotto forma di miscele bilanciate. Le colorazioni bicromiche si basano su l'utilizzo di due coloranti diversi che hanno affinità diverse con le diverse strutture della cellula e del tessuto.

Coloranti basici: (emallume, fucsina basica, carmallume) colora le strutture acide presenti nelle cellule (es: nucleo, ribosomi) e nei tessuti (es: cartilagine, secreti acidi).

- ➔ In questo caso il colorante ha carica positiva (catione) che interagisce con sostanze negative (Cl⁻ per esempio) e in generale con componenti anioniche (cariche negativamente) delle cellule e dei tessuti:
 - gruppi fosfato degli acidi nucleici (RNA e DNA);
 - gruppi solfato dei glicosaminoglicani;
 - gruppi carbossilici delle proteine;
 - l'eterocromatina e i nucleoli;
 - componenti citoplasmatiche come il reticolo endoplasmatico rugoso;
 - nella matrice extracellulare (gruppi solfato e e carboidrati complessi).
- ➔ I coloranti basici sono più selettivi e solo un numero limitato di sostanze nelle cellule e nella matrice extracellulare è basofila. La reattività dei gruppi anionici nei tessuti dipende dal pH:
 - pH 10 tutti e tre i gruppi vengono ionizzati e reagiscono con il colorante;
 - pH 5-7 sono ionizzati prevalentemente i gruppi fosfato e solfato;
 - pH <4 sono ionizzati solo in gruppi fosfato.

Coloranti acidi: (eosina, acido picrico) colorano i componenti basici sia cellulari (es: il citoplasma) che tissutali (es: tessuto osseo, connettivo).

- ➔ In questi caso il colorante ha carica negativa (anione) che interagisce con sostanze positive (Na⁺ per esempio) e in generale con i gruppi cationici della cellula e dei tessuti come:
 - i gruppi amminici delle proteine;
 - filamenti citoplasmatici;
 - componenti membranose intracellulari;
 - fibre extracellulari.
- ➔ I coloranti acidi sono meno specifici ma reagiscono con numerose sostanze acidofile.

5. Osservazione al microscopio:

INTERPRETAZIONE DI UN PREPARTO

Parametri da tenere in considerazione, osservando un preparato.

- **Forma delle cellule:** seguire i limiti delle cellule; cellule a stella, affusolata, cubiche, rotondeggianti, cilindriche, ecc.

- **Grandezza delle cellule:** rapporto nucleo/citoplasma (tessuti diversi hanno cellule di grandezza diversa).
- **Rapporti tra le cellule** (come sono organizzate le cellule le une con le altre): cellule isolate o a formare barriere o strutture particolari.
- **Strutture specializzate:** ciglia, flagelli, stereociglia, cuticole, presentano altre strutture differenziate.
- **Presenza di sostanza extracellulare:** in alcuni tessuti, la sostanza extracellulare è ben consistente, mentre in altri magari è quasi inesistente. Le cellule possono essere immerse in una sostanza amorfa (detta anche sostanza fondamentale, costituisce un gel compatto in cui sono immerse le fibre), isolate o a gruppi con presenza di fibre (sostanza extracellulare che verrà definita fibrosa).

Il **tessuto epiteliale** è caratterizzato da cellule poliedriche dotate molto vicine le une alle altre. Sono ancorate tra loro da sistemi di giunzioni tra le singole membrane cellulari e presentano uno spazio intercellulare esiguo.

Il **tessuto connettivo** è caratterizzato da celle di varia forma distanziate tra loro (*e dunque non vicine come nel tessuto epiteliale*) da un ampio spazio intercellulare (*matrice extracellulare*) la cui composizione determina il tipo di tessuto connettivo stesso.

Il **tessuto muscolare** è caratterizzato da cellule allungate con funzione contrattile o dalla fusione di più cellule (*sincizio*) a formare lunghe fibre. È un tessuto facile da riconoscere per alcune caratteristiche.

Il **tessuto nervoso** è caratterizzato da cellule (che sono i *neuroni*) con lunghi prolungamenti citoplasmatici (*e corpo cellulare a forma stellata*) con la capacità di ricevere, elaborare e trasmettere impulsi.

I preparati non sempre sono fatti bene! In alcuni casi possono essere presenti delle bolle che spesso vengono scambiati per cellule. Bisogna stare attenti ai cosiddetti artefatti.